

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 21620110153931

UDC_____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

**SAV4 在拟南芥生长素运输中
的功能研究**

**Functional Characterization of SAV4 in Auxin Transport in
*Arabidopsis thaliana***

葛艳花

指导教师姓名: 陶懿教授

专 业 名 称: 生化与分子生物学

论文提交日期: 2015 年 11 月

论文答辩时间: 2015 年 11 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2015 年 10 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

摘 要.....	VII
Abstract.....	IX
第一章 前言	1
1.1 避荫反应	1
1.1.1 避荫反应概述	1
1.1.2 生长素与避荫反应	2
1.2 向性反应	5
1.2.1 向光性反应	5
1.2.2 向地性反应	6
1.3 生长素运输	8
1.3.1 生长素运输载体	8
1.3.2 生长素运输的调控研究	12
第二章 材料与方法	15
2.1 实验材料	15
2.1.1 植物材料	15
2.1.2 菌株与载体	15
2.2 试剂的配制	15
2.2.1 抗生素的配制	15
2.2.2 植物激素及药物的配制	16
2.2.3 培养基的配制	16
2.2.4 核酸相关试剂及缓冲液的配制	17
2.2.5 蛋白相关试剂及缓冲液的配制	18
2.2.6 原核蛋白诱导表达与纯化相关试剂的配制	19
2.2.7 酵母转化相关试剂的配制	19
2.2.8 植物蛋白提取相关试剂的配制	20
2.2.9 数据分析及测量软件	21

2.3 实验方法.....	21
2.3.1 拟南芥实验操作	21
2.3.2 核酸分子生物学实验操作	22
2.3.3 蛋白质实验操作	26
2.3.4 酵母相关实验操作	29
2.3.5 GUS 染色及活性测定	30
2.3.6 激光共聚焦显微镜	31
2.3.7 生长素运输测定	32
2.4 实验中所用到的引物.....	32
2.5 主要仪器	35
第三章 实验结果与分析	37
3.1 <i>sav4</i> 表型分析.....	37
3.1.1 <i>sav4</i> 下胚轴表型	37
3.1.2 <i>sav4</i> 叶柄和叶夹角表型	37
3.1.3 <i>SAV4</i> 不参与光信号感应	39
3.2 <i>sav4</i> 致突变基因的定位	40
3.3 <i>SAV4</i> 基因的表达模式	42
3.4 <i>sav4</i> 影响生长素运输	42
3.4.1 <i>sav4</i> 不影响生长素的合成	42
3.4.2 <i>sav4</i> 具有生长素运输缺陷	45
3.5 <i>SAV4</i> 蛋白的亚细胞定位	47
3.5.1 <i>SAV4</i> 定位于细胞膜和细胞质中	47
3.5.2 <i>SAV4</i> 蛋白的动态性研究	50
3.5.3 微管药物不影响 <i>SAV4</i> 蛋白的膜定位	52
3.6 <i>sav4</i> 影响生长素在下胚轴的分布	53
3.6.1 <i>sav4</i> 影响生长素在下胚轴基部的分布	53
3.6.2 <i>sav4</i> 影响下胚轴的负向重力性	54
3.6.3 <i>sav4</i> 影响下胚轴的向光性	54
3.7 <i>SAV4</i> 与 <i>PIN3</i> 的相互作用	56
3.7.1 <i>sav4</i> 不影响 <i>PIN</i> 蛋白的定位和运输	56
3.7.2 <i>SAV4</i> 与 <i>PIN</i> 蛋白有相互作用	58

3.7.3 SAV4 与 PIN3 的遗传互作	59
3.7.4 SAV4 不影响 PIN3 的磷酸化以及 PIN3 介导的生长素运输	62
3.7.5 <i>sav4</i> 不影响 PIN3 在 DRM 的定位	65
3.8 SAV4 与 PID 的拮抗作用	66
第四章 讨论	68
附 录 缩写表	73
参考文献	74
致谢	87

Table of Contents

Abstract in Chinese..... 错误！未定义书签。II

Abstract in English 错误！未定义书签。

Chapter 1 Introduction..... 错误！未定义书签。

1.1 Shade avoidance 错误！未定义书签。

1.1.1 Summary of the shade avoidance 错误！未定义书签。

1.1.2 Auxin and the shade avoidance..... 错误！未定义书签。

1.2 Tropic responses 错误！未定义书签。

1.2.1 Introduction to phototropism 错误！未定义书签。

1.2.2 Introduction to gravitropism 错误！未定义书签。

1.3 Auxin transport 错误！未定义书签。

1.3.1 Introduction to auxin transporters..... 错误！未定义书签。

1.3.2 Study on the regulation of auxin transport..... 错误！未定义书签。

Chapter 2 Materials and methods 错误！未定义书签。

2.1 Materials..... 错误！未定义书签。

2.1.1 Plant materials..... 错误！未定义书签。

2.1.2 Bacterial strains and plasmids..... 错误！未定义书签。

2.2 Preparation of reagents..... 错误！未定义书签。

2.2.1 Preparation of antibiotics 错误！未定义书签。

2.2.2 Preparation of hormones and chemicals 错误！未定义书签。

2.2.3 Preparation of mediums 错误！未定义书签。

2.2.4 Nucleic acid-related reagents and buffer solutions..... 错误！未定义书签。

2.2.5 Protein-related reagents and buffer solutions 错误！未定义书签。

2.2.6 Reagents about protein expression and purification in *E.coli*..... 错误！未定义书签。

2.2.7 Regents about yeast transformation..... 错误！未定义书签。

2.2.8 Reagents about protein extraction from *Arabidopsis*... 错误！未定义书签。

2.2.9 Softwares about data analysis and measurement..... 错误！未定义书签。

2.3 Methods	错误！未定义书签。
2.3.1 Experiments and operations for <i>Arabidopsis thaliana</i>	错误！未定义书签。
2.3.2 Molecular cloning	错误！未定义书签。
2.3.3 Experiments abouts proteins	错误！未定义书签。
2.3.4 Yeast-related experiments	错误！未定义书签。
2.3.5 GUS staining and measurement of GUS activity	错误！未定义书签。
2.3.6 Confocal laser scanning microscopy	错误！未定义书签。
2.3.7 Measurements of auxin transport.....	错误！未定义书签。
2.4 Primers used in this study.....	错误！未定义书签。
2.5 Main instruments	错误！未定义书签。
Chapter 3 Results and analysis.....	错误！未定义书签。
3.1 Phenotype of <i>sav4</i>	错误！未定义书签。
3.1.1 Hypocotyl phenotype of <i>sav4</i>	错误！未定义书签。
3.1.2 Petiole and Leaf angle of <i>sav4</i>	错误！未定义书签。
3.1.3 <i>SAV4</i> is not involved in light perception.....	错误！未定义书签。
3.2 Cloning and characterization of <i>SAV4</i>	错误！未定义书签。
3.3 Expression pattern analysis of <i>SAV4</i>	错误！未定义书签。
3.4 <i>sav4</i> affects auxin transport.....	错误！未定义书签。
3.4.1 <i>sav4</i> does not affect auxin biosynthesis	错误！未定义书签。
3.4.2 <i>sav4</i> is defective in auxin transport.....	错误！未定义书签。
3.5 Subcellular localization of <i>SAV4</i> protein.....	错误！未定义书签。
3.5.1 <i>SAV4</i> localizes to the plasma membrane and cytoplasm.....	错误！未定义书签。
3.5.2 Research on the dynamics of <i>SAV4</i> protein	错误！未定义书签。
3.5.3 Microtubule-related drugs does not affect <i>SAV4</i> PM localization.....	错误！未定义书签。
3.6 <i>sav4</i> affects the auxin distribution in hypocotyls.....	错误！未定义书签。
3.6.1 <i>sav4</i> affects the auxin distribution in the basal parts of hypocotyls.....	错误！未定义书签。
3.6.2 <i>sav4</i> affects the hypocotyl gravitropism	错误！未定义书签。
3.6.3 <i>sav4</i> affects the hypocotyl phototropism	错误！未定义书签。
3.7 Interaction between <i>SAV4</i> and <i>PIN3</i>	错误！未定义书签。
3.7.1 <i>sav4</i> does not affect the localization and trafficking of <i>PIN</i> s.....	错误！未定义书签。

签。

3.7.2 Interaction between SAV4 and PINs.....错误！未定义书签。

3.7.3 Genetic interaction between SAV4 and PIN3错误！未定义书签。

3.7.4 SAV4 does not affect PIN3 phosphorylation and PIN3-mediated auxin transport错误！未定义书签。

3.7.5 *sav4* does not affect the PIN3 localization in DRM错误！未定义书签。

3.8 The antagonistic interaction between PID and SAV4 ...错误！未定义书签。

Chapter 4 Discussion 错误！未定义书签。

Appendix Abbreviations..... 错误！未定义书签。

References..... 错误！未定义书签。

Acknowledgement.....87

摘要

生长素,作为一种重要的植物激素,几乎参与调控了植物生长发育的各个阶段。生长素通过极性运输建立起生长素浓度梯度,并由此影响植物组织和器官的生长及分化。目前的研究表明,拟南芥避荫反应和向性反应(向光性和向地性反应)都需要正常的生长素运输。在本论文的研究中,我们鉴定了一株拟南芥避荫反应缺陷型突变体 *sav4*(*shade avoidance 4*)。在模拟遮荫下,*sav4* 下胚轴不能像野生型一样正常伸长。通过图位克隆技术,我们发现 *SAV4* 基因编码一个含有类 ARM 和类 TPR 结构域的未知功能蛋白。带有 C 端 YFP(黄色荧光蛋白)标签的 SAV4(SAV4-YFP)定位于细胞膜上。膜定位的 SAV4 具有极性分布,不管是在下胚轴还是根中,SAV4-YFP 都定位于细胞向顶芽的一侧。由于在模拟遮荫条件下,生长素类似物可以回复 *sav4* 下胚轴短的表型,以及遮荫诱导的生长素应答基因在下胚轴出现应答缺陷,说明 *sav4* 下胚轴生长素含量降低。通过测量黑暗下生长的幼苗,我们发现 *sav4* 的确存在生长素极性运输的缺陷。有趣的是,我们还发现在黑暗条件下,*sav4* 下胚轴负向重力反应增强。通过对生长素报告基因 *DR5::GUS/GFP* 的表达研究,我们发现 *sav4* 突变体的下胚轴中,*GUS* 报告基因的横向不对称表达分布的幼苗比例显著增强。在下胚轴的逆向地性生长中,*DR5::GFP* 在下胚轴不对称分布的形成在 *sav4* 突变体中比在野生型中更快。由此,我们认为 *SAV4* 的突变减弱了生长素在下胚轴的向基性运输,但是增强了横向运输。

生长素运输蛋白 PIN 也在植物的避荫反应和向性反应中起到了重要的作用。*sav4* 下胚轴对重力刺激的敏感性依赖于 PIN3 蛋白,表明 SAV4 有可能影响了 PIN 蛋白的功能。PID 蛋白激酶可以通过磷酸化 PIN 蛋白而改变其极性定位。我们发现 SAV4 与 PID 存在遗传互作。用酵母双杂交(Y2H)和免疫共沉淀方法,我们检测到 SAV4 和 PIN3 之间存在相互作用。然而,在 *sav4* 突变体中,我们没有检测到 PIN 蛋白的定位和动态有显著的改变。此外,二者的相互作用也没有影响 PIN3 的磷酸化以及 D6PK 激酶对 PIN3 运输活性的激活。综合以上结果,我们认为 SAV4 蛋白通过调控生长素的极性运输,影响生长素在植物体内的分布,进而影

响植物对环境因素的应答。

关键词：生长素运输 SAV4 蛋白 避荫反应 下胚轴负向重力性反应

厦门大学博士论文摘要库

Abstract

The phytohormone auxin is involved in essentially every aspect of plant growth and development. Through polar auxin transport, proper auxin gradient can be established, which then directs differentiation and growth. Shade avoidance and tropic responses are two well-known processes that require normal auxin transport. In this study, we have identified *sav4* (*shade avoidance 4*) as a mutant impaired in shade-induced hypocotyl in simulated shade. Through map-based cloning, we found that *SAV4* encodes a protein of unknown functions and contains armadillo (ARM)-repeat and tetratricopeptide repeat (TPR)-like domains. C-terminal tagged SAV4-YFP (yellow fluorescent protein) localizes to the plasma membrane. In addition, SAV4 is polarly distributed facing the shootward side in cells of the hypocotyl and the root. Because of the fact that the auxin analog could rescue the short hypocotyl phenotype of *sav4* and *sav4* hypocotyls was specifically defective in shade-induced auxin-responsive genes in shade, we speculate that *sav4* may affect polar auxin transport. To test this idea, we measured the basipetal auxin transport in hypocotyls of etiolated seedlings, and found that *sav4* was impaired in basipetal auxin transport, which was consistent with our hypothesis. Interestingly, we found that *sav4* mutant enhanced hypocotyl gravitropism. By using the auxin response reporter *DR5::GUS/GFP*, we found that *sav4* displayed an increased incidence of asymmetric auxin distribution across the hypocotyl. During the hypocotyl gravitropic response, the formation of asymmetrical *DR5::GFP* signal was faster in *sav4* than in the wild type. Hence, we infer that loss of *SAV4* will impair the basipetal auxin transport and increase lateral auxin transport in the hypocotyls.

The auxin efflux facilitator PINs play a critical role in both the shade avoidance and tropic responses. The hypocotyl gravitropism of *sav4* required functional PIN3, indicating that SAV4 may affect the auxin transport through regulating PINs. The protein kinase PID (PINOID) is capable of phosphorylating of PINs and directing

PINs localization. Our results showed that there was genetic interaction between SAV4 and PID. Furthermore, we detected the interaction SAV4 and PIN3 using Y2H and coimmunoprecipitation. However, PINs localization and trafficking were seemingly unaffected in the *sav4* mutant, and SAV4 did not affect PIN3 phosphorylation and the activation of PIN3 by D6PK-mediated phosphorylation. In summary, SAV4 is likely to affect auxin distribution within tissues and the plant responses to the environmental cues by regulating polar auxin transport.

Key words: auxin transport; SAV4 protein; shade avoidance; hypocotyl gravitropism

第一章 前言

1.1 避荫反应

1.1.1 避荫反应概述

作为固生生物，植物必须随时调整自己的生长和发育来适应外界环境的变化，这种形态发育的可塑性是通过植物感受、传导和整合环境信号来完成的。其中，光是一种重要的环境因子，它不仅是植物光合作用的能量来源，而且还是调控植物生长与发育过程的重要信号因子。

植物通过光受体(Photoreceptor)感应光信号，已知的光受体包括感受红光(R)和远红光(FR)的光敏色素(Phytochrome)，感受蓝光和紫外光区域 UV-A 的隐花色素(Cryptochrome)，感受蓝光的向光素(Phototropin)，感受紫外光区域 UV-B 的 UV-B 受体和主要感受蓝绿光的 ZTL(Zeitlupes)^[1]。在自然条件下，绿色叶片主要吸收红光和蓝光，反射远红光，从而引起植物周围红光：远红光(R:FR)比例的下降，形成遮荫。如图 1.1 所示，白光经过拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)叶片的遮挡，光强和 R:FR 都显著下降^[2]。光强和 R:FR 比例的降低会引起避荫植物，比如拟南芥，发生一系列生理及形态上的变化，这些变化称为避荫反应 (Shade avoidance response)。

避荫反应最明显的变化是引起植物茎的伸长^[3]，如图所示，在低 R:FR 下，野生型拟南芥的下胚轴会显著增加，而在避荫反应缺失突变体 *sav3-2*(*shade avoidance 3*)中则没有^[4](图 1.2)。避荫反应还会引起叶柄伸长，叶片偏下性减弱，叶片面积和叶绿素含量的减少^[5, 6]。如果遮荫信号持续，植物会提前进入生殖生长来保证自身繁殖。避荫反应的诱导对农业生产往往具有不利的影响，因为这一反应会使光合作用产物和能量由储存器官转移到茎和叶柄；而在单子叶植物中，遮荫诱导顶端优势增加还会减少分蘖，从而导致作物产量降低^[7]。避荫反应的影响还表现在降低了植物的防御反应，研究表明，避荫反应会使植物更容易受病原菌和害虫的侵害^[8-10]。因此，避荫反应已经成为了一个影响农作物产量的重要因素，也吸引了很多科学工作者研究其反应机制^[11, 12]。目前，通过降低 R:FR 比例

在实验室模拟自然状态的遮荫，很多实验室发现了多个与避荫反应相关的信号因子和调控蛋白^[4, 13-15]。

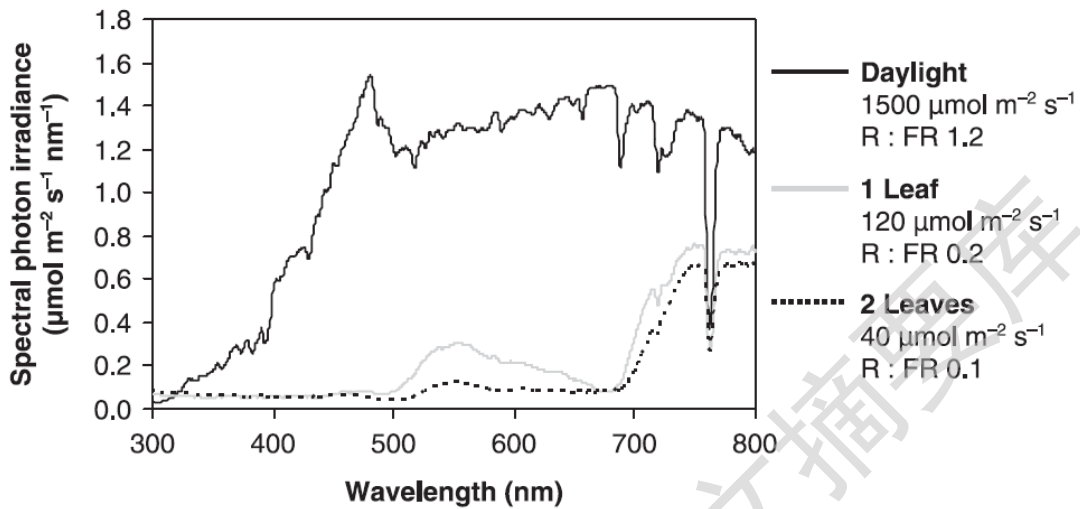


图 1.1 白光或者经拟南芥叶片滤过的白光的光谱分布^[2]

Fig. 1.1 Spectral photon distribution of day light and daylight filtered through *Arabidopsis* leaves



Col-0 sav3-2

图 1.2 野生型 Col-0 和避荫反应缺失突变体 *sav3-2* 的下胚轴在低 R:FR 的表型^[4]

Fig. 1.2 Phenotype of the wild-type Col-0 and shade avoidance mutant *sav3-2* in low R:FR

1.1.2 生长素与避荫反应

生长素(Auxin)是人类发现的第一个植物激素，它不仅调控植物的形态建成和器官发生，还参与了植物对外界环境的各种应答过程。IAA(Indole-3-acetic acid)是植物体内生长素的主要形式，在拟南芥幼苗中，IAA 主要是在茎尖、幼叶和根

尖中合成^[16]。此外,一些具有生长素活性的化合物也被广泛应用于科学研究和农业生产,比如 NAA(1-Naphthaleneacetic acid), 2, 4-D(2,4-dichlorophenoxyacetic acid)和 Picloram。

研究表明,生长素的合成、运输和反应过程都会影响植物的避荫反应^[4, 17]。低 R:FR 处理在短时间(1 小时)内会诱导叶片中 IAA 合成的增加,两天后在下胚轴中也会检测到 IAA 含量的上升^[4, 17]。在遮荫下,生长素运输抑制剂 NPA(N-1-naphthylphthalamic)会抑制生长素报告基因 *DR5::GUS*^[18, 19]在下胚轴中的表达,而叶片中的诱导则未受到影响,说明下胚轴中的生长素主要是由叶片中转运而来的^[4]。IPA(Indole-3-pyruvate)途径是植物体内合成 IAA 的重要途径,该途径为色氨酸依赖性途径。首先,色氨酸经 TAA1(Tryptophan aminotransferase of Arabidopsis 1)催化生成 IPA,然后 IPA 在 YUC (YUCCA, Flavin monooxygenase-like proteins)的催化下生成 IAA^[4, 20, 21]。*sav3/taal* 突变体在遮荫下会表现出避荫反应的缺失,如下胚轴和叶柄有伸长缺陷,叶片面积减小等等,说明 TAA1 介导的 IAA 合成是植物避荫反应中不可或缺的组分。尽管 TAA1 在生长素合成中作用很关键,但它并不是一个限速酶,因为 TAA1 过表达不会造成生长素过度积累^[4]。拟南芥含有 11 个 YUC 基因,一些 YUCs 在遮荫下会被强烈诱导,比如 *YUC2*、*YUC5*、*YUC8* 和 *YUC9*^[13, 20, 22]。*yuc1yuc4* 下胚轴在遮荫下与 *sav3/taal* 一样短小,YUC 过表达则会造成生长素积累,使下胚轴明显伸长^[23],说明 YUC 介导的生长素合成是 IAA 合成中的一个限速酶,并且该过程对避荫反应是必不可少的。

生长素要经过极性运输由叶片转移到下胚轴才能促进下胚轴延伸,如果用 NPA 阻断生长素运输或者是生长素运输载体 *PIN3(PIN-FORMED 3)*的突变,都会抑制下胚轴在遮荫下的伸长^[4, 17],说明避荫反应需要完整的生长素运输途径。Keuskamp 等的研究结果表明,遮荫会影响 *PIN3* 蛋白的定位,而 *PIN* 蛋白的极性定位又直接决定了生长素运输的方向^[24]。*PIN3* 在高 R:FR 下定位于内皮层细胞的底部,这与生长素运输的方向是一致的,而低 R:FR 会引起 *PIN3* 由底部转移到侧面,使生长素由维管束运输到表皮细胞,从而促进其伸长^[25]。与此相一致,在低 R:FR 下,生长素反应报告基因 *IAA19::GUS*在叶柄两侧的表达会增强^[26]。

生长素进入细胞后会入核与生长素受体 TIR1/AFBs(Transport inhibitor

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.